



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0102639
(43) 공개일자 2017년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/537 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/537 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0024991
(22) 출원일자 2016년03월02일
심사청구일자 2016년03월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김진성
서울특별시 서초구 신반포로 270, 103동 1102호
장문석
서울특별시 용산구 이촌로64길 15, 105동 102호(이촌동, 엘지한강자이)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

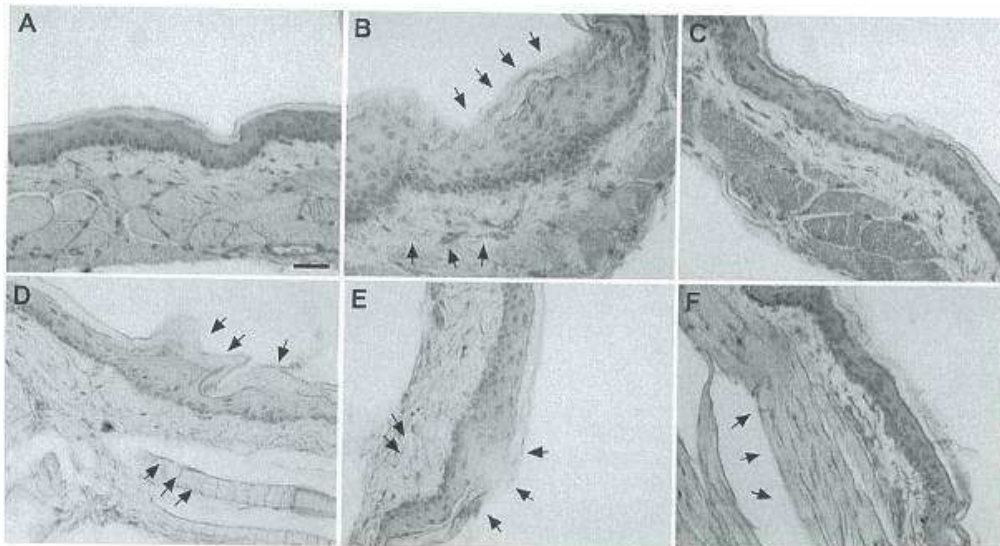
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 5-플루오로우라실에 의해 유발된 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 본 발명의 단삼 추출물이 DPPH radical 소거 활성, 세포독성에 대한 보호, ROS(reactive oxygen species) 생성 억제, 세포사멸 회복 및 사이토카인 생성 억제에 효과가 있는 것을 확인함으로써 암환자에서 시행되는 항암화학요법 및 방사선 요법으로 발생된 부작용 가운데 하나인 구강내 점막염을 효과적으로 치료하는데 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)

A61Q 11/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/312 (2013.01)

(72) 발명자

김도림

경기도 김포시 김포한강5로 417, 101동 1902호(우
미린아파트)

오자영

서울특별시 송파구 올림픽로8길 20, 720호(아이파
크)

명세서

청구범위

청구항 1

단삼(Salviae Miltiorrhizae Radix) 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 구강내 점막염은 항암화학요법에 의해 발생된 것을 특징으로 하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단삼 추출물은 단삼을 증류수로 추출하여 감압 농축한 것을 특징으로 하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단삼 추출물은 DPPH radical 소거 활성, 세포독성에 대한 보호, ROS(reactive oxygen speicies) 생성 억제, 세포사멸 회복 및 사이토카닌 생성 억제의 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강용 위생 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 구강용 위생 조성물은 치약, 구강 세정제, 구강용 스프레이 및 구강용 연고제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 구강용 위생 조성물.

청구항 7

단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단삼(danshen, Salvia miltiorrhiza Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생식물로, 활혈거어(活血祛瘀), 양혈소종(凉血消腫)시키는 효능이 있어 한방에서 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통 및 어혈성의 심복부동통, 타박상의 치료와 불면증, 피부발진 등의 약제로 쓰인다.

[0003] 단삼의 주요 화학성분으로는 탄시논(tanshinone) I, II A, II B 등을 포함하는 디터펜(diterpene) 화합물과, 살비안산 A(salvianic acid A), 프로토크테퀴의 알데히드(protocatechuic aldehyde), 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 등을 포함하는 페놀 화합물(phenolic compound), 그 외에 바이칼린(baicaline), β -시토스테롤(β -sitosterol), 우솔릭산(ursolic acid), 비타민 E(vitamin E)와 타닌(tannin) 등이 알려져 있다.

[0004] 단삼의 밝혀진 생리활성으로는 항균, 항산화, 항암, 항돌연변이, 단삼유래 마그네슘 살비아놀레이트(magnesiumsalvianolate 또는 magnesium lithospermate)의 간염에의 효과가 알려져 있으며, 항혈전 효능에 대

해서는 항응고제로 많이 사용되는 와파린(wafarin)의 작용을 증진시키는 것이 시사되었으나 기전에 관한 연구는 부족한 실정이다.

[0005] 구강내 점막염(oral mucositis)은 항암화학치료와 방사선 치료 후 발생하는 흔한 부작용 가운데 하나이다. 구강내 점막염은 많은 환자들에게 심한 통증을 유발하여 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라, 일부 환자에서는 구강내 점막염으로 인하여 적절한 용량의 항암치료를 할 수 없게 되거나 계획된 항암치료를 하지 못하게 만들기도 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 천연물 유래의 기능성 약제학적 소재를 연구하던 중, 단삼 추출물이 항암화학치료로 유발된 구강내 점막염을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강용 위생 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 구강내 점막염은 항암화학요법에 의해 발생된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단삼 추출물은 단삼을 증류수로 추출하여 감압 농축한 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단삼 추출물은 DPPH radical 소거 활성, 세포독성에 대한 보호, ROS(reactive oxygen speicies) 생성 억제, 세포사멸 회복 및 사이토카인 생성 억제의 효과를 갖는 것일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강용 위생 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명이 일실시예에 있어서, 상기 구강 위생 조성물은 치약, 구강 세정제, 구강용 스프레이 및 구강용 연고제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 제형을 갖는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 단삼 추출물은 PPH radical 소거 활성, 세포독성에 대한 보호, ROS(reactive oxygen speicies) 생성 억제, 세포사멸 회복 및 사이토카인 생성 억제에 효과가 있으므로 암환자에서 시행되는 항암화학요법 및 방사선 요법으로 발생된 부작용 가운데 하나인 구강내 점막염을 효과적으로 치료하는데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 단삼 추출물의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 확인한 결과 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 단삼 추출물이 human pharyngeal cell의 세포 생존에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 단삼 추출물이 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 단삼 추출물이 Humanpharyngeal cell line에서 apoptosis 단백질의 발현에 미치는 영향을 확

인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 단삼 추출물이 점막염 유발 햄스터의 cheek pouches의 조직에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 단삼 추출물이 구강내 점막염 유발 햄스터의 cheek pouches의 조직에서 세포사멸을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 단삼 추출물이 구강내 점막염 유발 햄스터의 cheek pouches의 조직에서 NF- κ B, IL-1 β , TNF- α 및 Caspase-3 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명은 단삼 추출물은 항암화학치료와 방사선 치료 후 발생하는 흔한 부작용 가운데 하나인 구강내 점막염을 치료하는데 사용할 수 있음을 규명한 점에 그 특징이 있으며, 구체적으로 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0021] 구강내 점막염은 항암화학치료와 방사선치료 후 흔히 발생하는 부작용으로 과거 항암치료의 가장 주요한 부작용은 구토 증상과 골수억제로 인한 면역력의 감소였으나 항구토제와 조절세포 성장인자의 비약적인 발달로 인하여 많이 해결된 반면, 최근에는 점막염이 암환자 치료 중 가장 심각한 부작용으로 알려져 있다.
- [0022] 구강내 점막염은 많은 환자에서 심각한 통증을 유발하여 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라, 호중구 감소증이 동반된 암환자에서는 패혈증의 고위험 인자이므로 임상적으로 중요한 질환이다. 더구나 일부 환자에서는 점막염으로 인하여 적절한 용량의 항암치료를 할 수 없게 되거나 계획된 항암치료를 취소 혹은 연기하도록 만들기도 한다.
- [0023] 구강 점막의 상피세포는 체내에서 가장 빨리 성장하는 조직으로 정상적으로 구강과 위장관의 점막세포는 7 - 14 일 주기로 교체된다. 항암제는 점막세포의 재생을 방해하며 환자의 영양 부족이 이를 더욱 악화시킨다. 통상적으로 점막염은 항암제 투여 후 5 - 7일에 발생하고 백혈구감소증이 없으면 보통 2 - 3주 사이에 치유되며 주로 입술, 뺨, 연구개에 호발하고 단순 발적부터 궤양까지 다양한 병변을 보인다.
- [0024] 일반적인 구내염은 다양한 인자가 관여하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 스트레스, 외상, 유전적 문제 등의 소인을 바탕으로 박테리아와 같은 감염과 같은 악화인자와 타액과 점막각화도 같은 구강을 보호하는 방어인자들의 복합적인 상호작용으로 발생한다. 반면, 항암제로 유발된 구강내 점막염의 경우는 다른 양상을 보인다. 항암제가 분열중인 상피모세포에 비특이적인 손상을 입혀 나타나는 상피조직에 국한된 현상으로서, 항암제의 독성이 기저 상피세포층에 손상을 입히고, 이는 상피의 재생능을 떨어뜨려 결국 클론원성 세포사, 위축, 그리고 궤양에 이르는 상피 변화가 초래된다.
- [0025] 일 구체예에서, 구강내 점막염의 발생과 관련된 싸이토카인의 역할이다. 항암치료 후 나타나는 부작용의 정도와 환자의 말초혈액 중 TNF- α , interleukin 1 (IL-1), 및 IL-6의 농도와 관련되어 있으며, 동물실험에서 점막의 IL-1 β 농도와 TNF- α 의 발현 정도가 점막염의 발생과 연관이 있다. 또한 이들 싸이토카인의 농도를 감소시키는 약물 치료로 점막염의 발생을 예방할 수 있음이 실험실 및 임상 연구에서 확인되었다.
- [0026] 구강의 점막염이 처음 발생하는 과정은 항암제로 인한 산화 스트레스 및 ROS (reactive oxygen species)가 발생하는 것이다. 이는 점막염을 유발하는 대부분의 경로에서 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, ROS는 그 발생원인(항암제, 방사선)에 상관없이 직접적으로 각종 세포와 조직, 혈관에 손상을 가해 급성 조직 반응으로 규정되는 일련의 현상을 초래하는 전사인자들을 활성화시킨다. 여러 연구 결과에서 oxygen-free radical을 효과적으로 억제하거나 제거하는 약제들이 점막의 손상을 성공적으로 지연시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.
- [0027] 따라서 본 발명자들은 단삼 추출물이 구강내 점막염에 활성이 있다는 것을 본 발명의 일실시예를 통해 확인하였는데, 일실시예에 의하면 단삼 추출물을 이용하여 human pharyngeal cells를 대상으로 DPPH radical 소거 활성, 항암제인 5-fluorouracil(5-FU)에 의해 유도된 세포독성에 대한 보호효과, 5-FU에 의한 ROS(reactive oxygen species) 생성 억제 효과를 확인하였고, 5-FU로 유발된 구내염 동물모델을 이용하여 햄스터의 cheek pouches의 조직학적 염증의 회복, 세포사멸 회복효과, 항염증관련 단백질 발현 및 caspase 3의 유의한 변화를 확인할 수 있었다.

- [0028] 본 발명의 단삼 추출물은 단삼을 증류수로 추출하여 감압 농축한 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명에 따른 단삼 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 ‘추출물’은 적절한 용매를 이용하여 단삼으로부터 추출한 것이다.
- [0030] 다.
- [0031] 상기 단삼으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 증류수를 사용하는 것이 좋다.
- [0032] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 단삼 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0033] 예를 들면, 본 발명의 구성물에 포함되는 단삼 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다.
- [0034] 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0035] 따라서 본 발명에 있어서 단삼 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0036] 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강용 위생 조성물을 제공한다.
- [0037] 상기 구강 위생 조성물은 치약, 구강 세정제, 구강용 스프레이 및 구강용 연고제로 제조될 수 있다.
- [0038] 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강내 점막염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 건강기능식품은 구강내 점막염 질환 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0041] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0042] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 단삼 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0044] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 단삼 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 단삼 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0045] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 단삼 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0046] 본 발명의 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 DPPH radical 소거 활성, 항암제인 5-fluorouracil(5-FU)에 의해 유도된 세포독성에 대한 보호효과, 5-FU에 의한 ROS(reactive oxygen species) 생성 억제 효과를 확인하였고, 5-FU로 유발된 구내염 동물모델을 이용하여 햄스터의 cheek pouches의 조직학적 염증의 회복, 세포사멸 회복효과, 항염증관련 단백질 발현 및 caspase 3의 유의한 변화를 확인하였으므로 구강내 점막염 예방 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] <실시예>

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] 재료 및 방법

[0054] 1. 실험재료 및 시약

[0055] 본 발명을 위해서 Fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, USA), dulbecco's modified eagle medium (DMEM; GIBCO BRL, USA), trypsin-EDTA (GIBCO BRL, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ethanol 99.9% (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA), 5-fluorouracil (Sigma, USA) 등이 사용되었다.

[0056] SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 와 Western blotting assays를 위해 Nuclear extract kit (Active & Motif, USA), Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA), 30% acrylamide mix (Bio-Rad, USA), SeePico CBB stain kit (Benebiosis, Korea), anti- NF- κ B, anti- caspase 3, anti- TNF- α (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) and anti- β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), methanol (Sigma Chemical Co., USA), conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co., USA), ammonium persulfate (Sigma Chemical Co., USA), N, N, N, N'-tetramethylethylenediamine (TEMED, Sigma Chemical Co., USA), dithiothreitol (DTT, Sigma Chemical Co., USA), bromophenol blue (Sigma Chemical Co., USA), Tween 20 (Sigma Chemical Co., USA), glycine (Sigma Chemical Co., USA), Trizma base (Sigma Chemical Co., USA), skim milk (Becton Dickison, USA), glycerol (Showa, Japan), nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Germany), sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Chemical Co., USA), and gel blotting paper (Schleicher & Schuell, Germany) 등을 사용하였다.

[0058] 2. 시료의 제조

[0059] 단삼(Salviae Miltiorrhizae Radix) 300g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 1차 증류수 3,000ml에 넣어 환류추출기를 이용하였다. 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 120분 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 단삼 동결건조 추출물은 69.1g을 얻었으며, 수율은 23.03%이었다.

[0061] 3. 세포주 및 세포배양

[0062] Human pharyngeal cell line (Detroit 562, ATCC CCL138)은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 세포주 Detroit 562 cell line은 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL), 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 Modified Eagle's Medium (MEM) (Gibco-BRL, GrandIsland, NY, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

[0064] 4. 단삼의 DPPH radical 소거 활성 측정

[0065] DPPH radical scavenging activity를 알아보기 위하여, 동결건조된 단삼 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도로 시액을 제조하였다. 양성 대조군으로 시료와 같은 농도의 ascorbic acid를 사용하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 ethanol에 녹인 0.1mM DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가하여 잘 흔들어 섞어준 후, 실온에서 30분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 하기 표 1의 수학적식을 이용하여 계산하였다.

표 1

[0066]	$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(AB-AT)/AB] \times 100$ AB: absorbance of blank sample AT: absorbance of tested extract solution
--------	--

[0068] 5. Detroit 562 cells에 대한 단삼의 세포 독성 측정

[0069] 5-fluorouracil에 의해 유도된 세포독성(cytotoxicity)에 대한 단삼의 보호효과를 알아보기 위해 MTT test를 응용하여 실험하였다³⁾. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 10 µM 5-fluorouracil를 각각의 well에 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5mg/ml MTT 20 µl와 FBS free DMEM 200 µl을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광한 뒤 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거 DMSO를 200 µl 처리한 후 37℃에서 2시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0071] 6. ROS (reactive oxygen species) 생성 측정

[0072] 단삼의 5-fluorouracil에 의한 ROS 생성 억제 효과를 알아보기 위해 ROS detection kit(Cell biolabs, USA)의 manual을 이용하여 실험하였다. 농도별 단삼 (1, 10, 100 µg/ml)과 10 µM의 5-fluorouracil 처리 후 100 µl(100 µM)의 DCF-DA를 첨가하여 37℃ 조건에서 1시간 배양하였다. Media를 제거하고 1X PBS 로 2회 세척 한 다음 새로운 serum free media 100 µl와 2X Cell Lysis buffer 100 µl를 넣어 상온에서 5분간 배양하였다. Mixture 150 µl를 96 well plate에 옮겨 fluorescence plate reader (Fluoroskan Ascent 6-96 Well Plate Reader, ThermoFisher Scientific, U.S.A.) 485nm excitation, 530 nm emission wavelength에서 측정하였다.

[0074] 7. 동물실험 방법

[0075] 7-1. 실험동물

[0076] 실험동물은 Golden Syrian hamster 수컷 24마리(8주, 100~110 gm)를 중앙실험동물(주)로부터 공급받아 사용하였다. 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 45~55%, 조도 300lux (단상 50~90cm²) 및 명암주기 12시간의 환경에서 사육하였고 햄스터용 고형 사료(퓨리나, 바이오피아) 및 음료는 무제한으로 제공하였다. 실험동물은 1주일간의 순화과정을 거친 후 6군(정상군, 음성대조군, 양성대조군, 약물처리군 (100, 500, 1000mg/kg))으로 나누어 실험에 이용하였다.

[0078] **7-2. 5-Fluorouracil에 의한 구강점막염 유발**

[0079] 햄스터는 무작위적으로 다음과 같이 6 group으로 나누어 실험하였다: 정상군 (N: vehicle-treated, n = 6), 음성대조군(C: 5-fluorouracil (5' -flu : 80 mg/kg, i.p. only treated, n =6), 양성대조군 (P: 0.15% benzydimine HCL, o.p. only treated, n=6 단삼과 5' -flu 처리군 (5' -flu + SM: 100, 500, 1000 mg/kg SM and 5' -flu 80 mg/kg, o.p., n=6/group)

[0080] 구강점막염의 유발방법은 정상군을 제외한 대조군 및 약제 투여군에 실험 0, 2일에 80mg/kg 5-Fluorouracil(5' -flu)를 복강주사 하였다. 인체에서 정상적인 저작운동에 의하여 일어날 수 있는 구강점막의 손상과 동일한 환경을 제공하고자 주사침(18-gauge)을 이용하여 수술현미경하에 소창(scratching wound)을 가하였다. 소창은 협점막을 외번(eversion)시킨 상태에서 홍반성 변화가 나타날 정도 2일 동안 매일 선형으로 3차례씩 자극하였다. 양성대조군인 benzydimine HCL (0.15%)과 100, 500, 1000mg/kg 농도의 단삼은 구강점막염 유발 후 2주간 구강투여 하였다.

[0082] **7-3. Hematoxylin-eosin(HE) 염색**

[0083] 파라핀 절편기를 이용해 5 μ m으로 자른 cheek pouches 조직을 4% PFA 고정액(4% Paraformaldehyde, 0.1M PB, pH=7.0)으로 30분간 고정하여 흐르는 물에서 10분간 씻어낸 후 Hematoxylin액에 1분간 염색하고, 5분간 씻어내어 1% 염산 70%의 에탄올에서 색을 내어 핵만 염색될 때까지 반복하여 수행하였다. 핵이 염색될 시점에 80%의 에탄올에 담근 후 eosin액에 1분간 담근 후 재차 씻어 내고 탈수시켜 Canadian balm으로 봉입하였다.

[0085] **7-4. 세포사멸 확인을 위한 TUNEL 염색**

[0086] 세포사멸 (programmed cell death, apoptosis)을 관찰하기 위하여 ApoTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit(Chemicon, USA)을 사용하였다. 파라핀 절편기를 이용해 7 μ m 로 잘라 슬라이드에 붙여 건조시키고 4%의 PFA 고정액으로 고정한 후 TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 방법을 시행하였다. PBS 로 3회 씻어내고 0.3% 과산화수소로 15분간 내재적 과산화효소를 차단시킨 후 PBS로 10분간 3회 씻어냈다. Eililibrium buffer로 10분간 반응시킨 후 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)를 2:1 비율로 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 반응시켰다. Stop-Wash buffer에 10분간 반응시키고 PBS로 3회 세척한 후 anti-digoxigenin에 30분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 DAB로 3분간 발색하여 hematoxylin으로 대조 염색한 후 mounting media로 봉입하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0088] **7-5. Western blot analysis**

[0089] 25 μ g의 단백질을 6~15% SDS-PAGE gel에 전기영동(electrophoresis)을 시행한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane 으로 100v에서 전기이동을 시켰다. 전기이동이 끝난 membrane에 blocking buffer(5% 탈지분유가 함유된 TPBS)를 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하고, blocking buffer에 1:1000으로 희석한 일차항체를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 반응시켰다. 일차 항체로는 IL-1 β (Sata Cruz Biotechnology, Inc., USA), TNF- α (Sata Cruz Biotechnology, Inc., USA), NF- κ B, β -tubulin(Sata Cruz Biotechnology, Inc., USA)이다. Washing buffer(0.05% Tween 20이 함유된 PBS)로 충분히 세척한 후, horseradish peroxidase 가 결합된 anti-goat IgG 또는 anti-rabbit IgG (Cell Signalin Technology Inc., Danvers, MA, USA) 이차 항체를 1:1000으로 희석해 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. Washing buffer로 충분히 세척한 후, ECL(Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)을 처리하여 X-ray 필름(Agfa HealthCare, Greenville, SC, USA)에 감광시켰다.

[0090]

[0091] **8. 통계분석**

[0092] 본 발명에서 얻어진 모든 결과는 Window용 SPSS(ver 11.0, Chicago, USA) 통계 프로그램을 이용하여, 각 변인에 대한 기술 통계치(mean $\pm$ SD)를 산출하고 집단 간 변인들의 차이를 확인하기 위해 독립 t검증(Independent- t test)을 실시하였다. 이때 가설 유의 기준은 $\alpha=0.05$ 수준으로 설정하였다.

[0094] **실시예 1: 단삼의 DPPH radical 소거 활성 확인**

[0095] 단삼의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 ascorbic acid와 단삼은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 단삼은 각각 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 20.3, 24.21, 24.95, 58.65, 61.96%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

[0096] 또한, 양성대조군인 ascorbic acid (AC)의 경우 20.35, 54.08, 53.39, 59.95 와 64.23%의 소거 활성을 나타내었다(도 1 참조). Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 ascorbic acid는 4.6 $\mu\text{g/ml}$, 단삼은 42.6 $\mu\text{g/ml}$ 이다.

[0098] **실시예 2: 단삼이 human pharyngeal cell의 세포 생존에 미치는 영향 확인**

[0099] 단삼이 human pharyngeal cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. human pharyngeal cell인 Detroit 562 cells을 FBS가 첨가되지 않은 MEM 배지에서 24 h 배양하여 growth-arrested 상태로 유지하였고 10 μM 5' flu와 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 단삼을 48h 동안 처리하였다. 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 단삼 처리한 군에서 107.23; 120.15, $p < 0.01$; 118.90, $p < 0.01$; 111.86, $p < 0.05$; 128.97%, $p < 0.01$ 로 세포 생존율이 정상군에 비해 높게 나타났다(도 2A 참조). 5' flu 처리한 음성대조군은 56.01%로서 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였고 ($p < 0.001$), 5' flu와 단삼 농도별 (1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) 동시 처리군에서는 75.19, $p < 0.01$; 78.43, $p < 0.001$; 81.33, $p < 0.001$; 102.1, $p < 0.01$; 95.97, $p < 0.01$ 의 생존율을 나타내 5' flu에 의해 유도된 세포독성에 대해 유의한 보호효과를 나타내었다(도 2B 참조).

[0101] **실시예 3: 단삼이 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향 확인**

[0102] Human pharyngeal cell line에서 단삼이 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 ROS detection kit를 사용하여 단삼이 세포 내 ROS 생성 및 보호에 미치는 영향을 조사하였다. 5' -flu 처리한 대조군은 정상군에 비해 유의하게 ROS 생성이 증가하였다. 그러나 10 μM 5' -flu 처리로 ROS 생성을 유도한 후 단삼 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 군에서는 ROS의 생성이 억제됨을 알 수 있었다(도 3 참조).

[0104] **실시예 4: 단삼이 apoptosis 단백질 발현에 미치는 영향 확인**

[0105] Human pharyngeal cell line에서 단삼이 apoptosis 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 핵 내의 NF- κB 와 Cleaved caspase-3의 발현은 10 μM 5' -flu 처리한 음성대조군에서 정상군에 비해 증가하였으며(127.6% and 126.7%, $p < 0.01$) 10 μM 5' -flu와 단삼 1, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 48 h 동안 동시 처리한 군에서 NF- κB 의 발현은 유의하게 감소하였다(103.2%, $p < 0.01$ and 101.95%, $p < 0.05$).

[0106] 또한, 단삼 1, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 Cleaved caspase-3의 발현은 각각 105.1, 101.6%로 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$)(도 4 참조)

[0108] **실시예 5: 단삼이 cheek pouches 조직에 미치는 영향 확인**

[0109] 단삼이 점막염 유발 cheek pouches 조직에 미치는 영향을 확인한 결과 Hematoxylin and Eosin 염색을 수행하여 cheek pouches의 조직학적 변화를 관찰하였다. 정상군의 채취된 cheek pouches 조직에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았고 과립층과 기저층에서 아무런 이상 증후를 발견할 수 없었다. 그러나 5-fluorouracil (5' -flu : 80mg/kg, i.p.)에 의해 유도된 점막염 모델군에서는 각질층의 변형이 일어나며 협점막의 상피층이 두꺼워지고 과립층과 기저층의 경계가 허물어지는 것을 관찰할 수 있었다(도 4B 참조). 그러나 양성대조군인 benzydine HCL 처리군에서는 상피층의 회복을 나타냈으며(도 4C 참조) 500, 1000mg/kg 의 단삼 처리군에서도 같은 소견을 나타내었다(도 4E 및 4 F 참조).

[0111] **실시예 6: 구강점막염 유발 햄스터 cheek pouches에서 세포사멸 관찰 확인**

[0112] 5' flu로 유발한 구강점막염의 cheek pouches 조직에서 apoptosis의 유발과 약제에 대한 회복을 TUNEL 염색을

통해 연구하였다. TUNEL 실험결과 점막염 유발 cheek pouches 조직에서 정상군에 비해 세포사멸이 관찰되었으며 (도 5B 화살표 참조) 반면에 양성대조군과(도 5C 참조) 단삼 100, 500 및 1000mg/kg 처리군에서는 (도 5D, 도 5E 및 도 5F 참조) 과립층에서 회복효과가 있음을 확인하였다.

[0114] 실시예 7: 단삼이 항염증관련 단백질 발현에 미치는 영향 확인

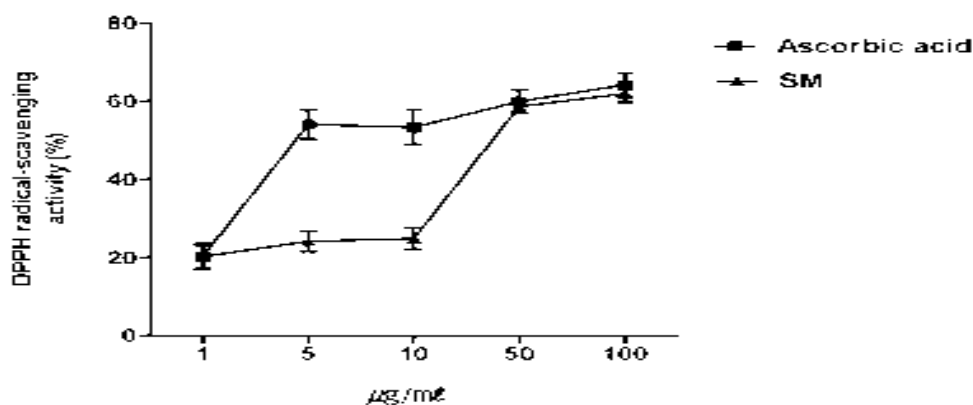
[0115] 5' -flu처리된 유발된 구강점막염 모델에서 염증과 관련된 pro-inflammatory cytokines (NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , Caspase-3)의 단백질 발현수준을 알아보기로 Western blotting을 실시하였다. internal control은 β -tubulin을 사용하였다.

[0116] 그 결과, 핵 내의 NF- κ B의 발현은 음성대조군에서 정상군에 비해 증가하였으며(136.01%, $p < 0.01$) 양성대조군 benzydimine HCL 처리군과 단삼 1000mg/kg의 농도에서 유의하게 감소하였다 94.7 %, $p < 0.01$ and 108.7%, $p < 0.05$). TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 발현은 음성대조군인 점막염 유발 모델에서는 정상군에 비해 증가함을 알 수 있었다 (141.5%, $p < 0.05$; 147.0, $p < 0.01$, respectively). 그러나 양성대조군에서는 TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 발현이 각각 110.1%, $p < 0.01$; 129.9%, $p < 0.01$;로 음성대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 또한 1000 mg/kg 의 단삼과 5' flu 동시 처리군에서도 TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 발현수준이 감소하였다 (118.19%, $p < 0.05$ and 115.3%, $p < 0.05$, respectively, 도 6). Cleaved caspase-3의 발현 또한 음성대조군에서 증가하였으며 (136.62%, $p < 0.05$) 양성대조군과 500, 1000mg/kg의 농도에서 발현이 감소하였다(108.3%, $p < 0.05$; 103.7%, $p < 0.05$; and 96.1%, $p < 0.01$, respectively)(도 6 참조).

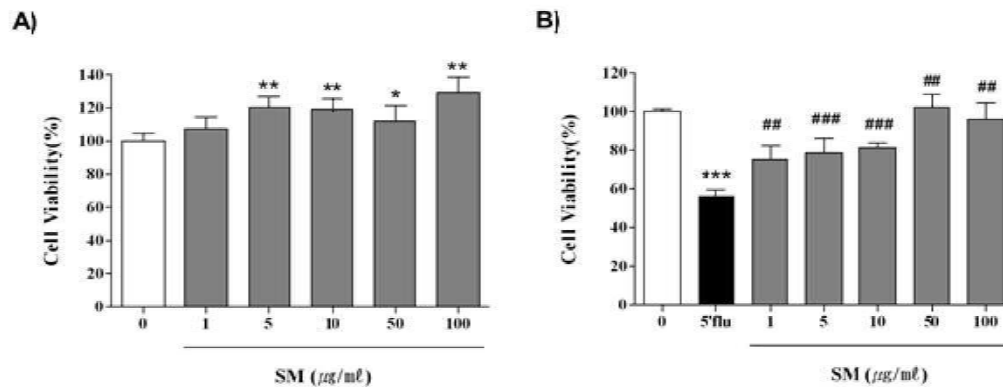
[0118] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

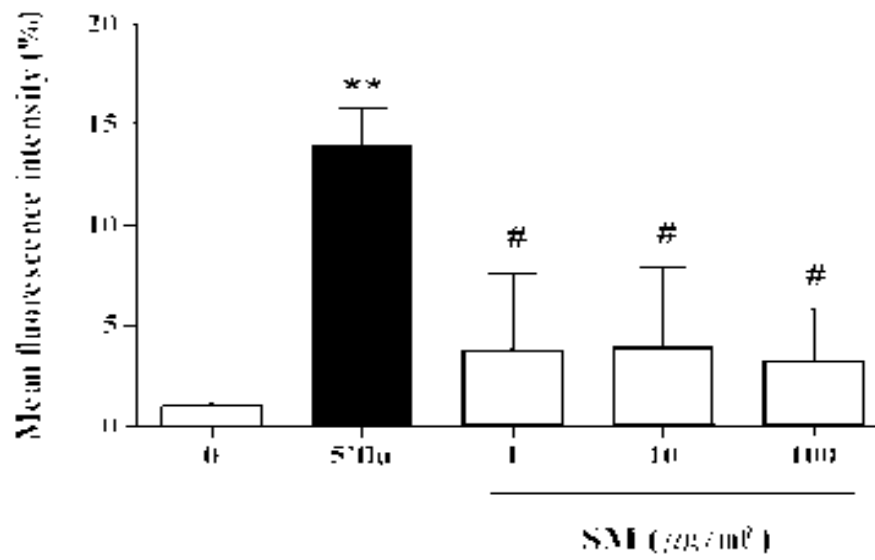
도면1



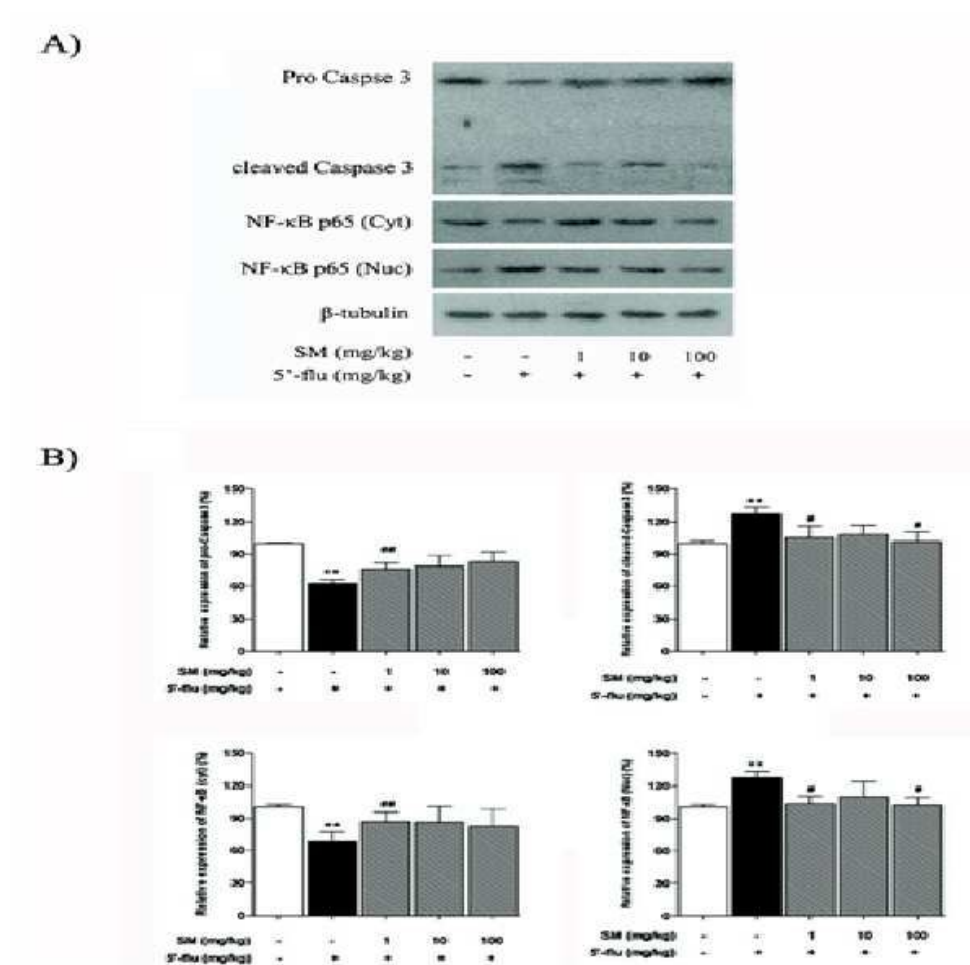
도면2



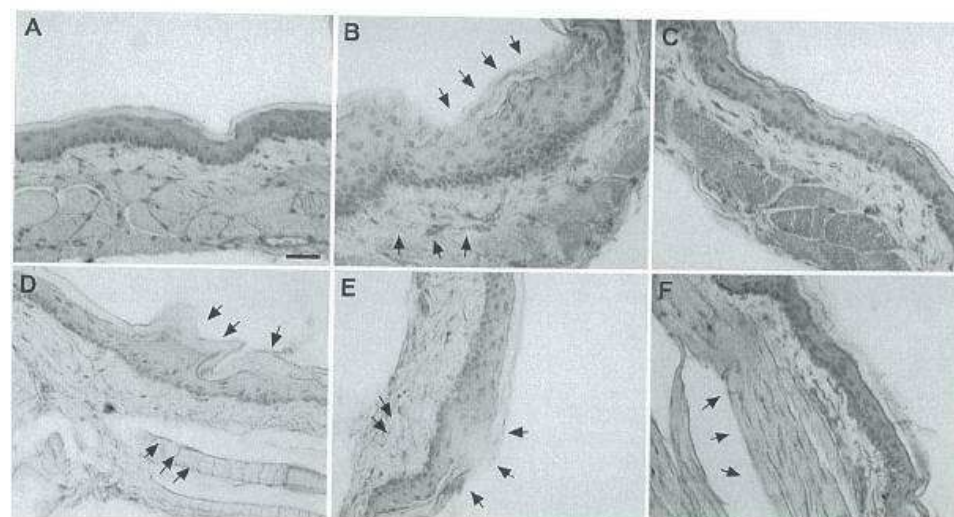
도면3



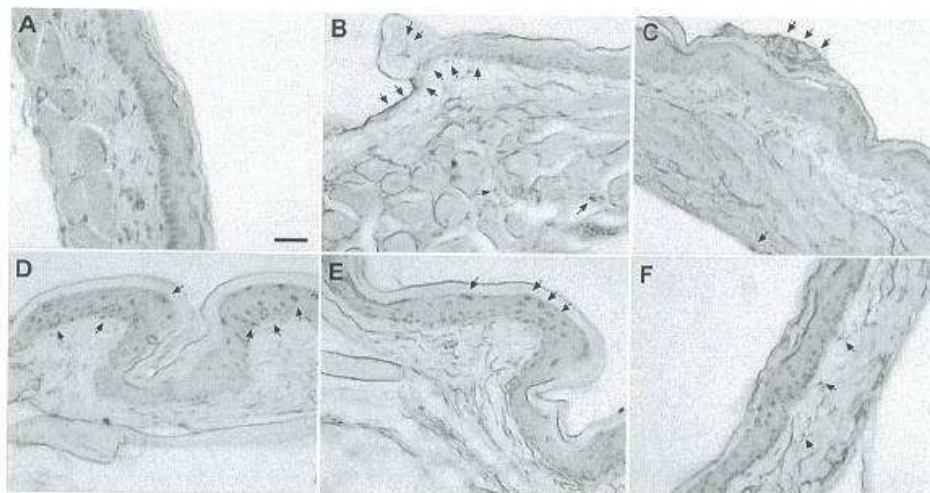
도면4



도면5



도면6



도면7

